



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Toxicidad de un microcontaminante acuático sobre
microalgas

Toxicidade de un microcontaminante acuático sobre
microalgas

Toxicity of an aquatic microcontaminant on microalgae

Iago Iglesias Corrás

Julio, 2018

Dirigido por: Carmen Rioboo Blanco

ÍNDICE

Resumen y palabras clave	1
Introducción	2
Objetivo	4
Material y métodos	4
Resultados y discusión	9
Conclusiones	16
Referencias	18
Abreviaturas	22

RESUMEN

La producción de medicamentos y productos para la higiene ha aumentado considerablemente en los últimos años. En consecuencia, los análisis químicos de aguas superficiales detectan cada año concentraciones mayores de estas sustancias. La mayoría de productos farmacéuticos llegan a las aguas dulces a través de las EDAR, donde no pueden ser eliminados por completo. Algunos de ellos, como el triclosán, son conocidos por su frecuente uso como antimicrobiano. Cuando este tipo de sustancias son liberadas al medio ambiente suponen un peligro potencial para la estabilidad de los ecosistemas. Uno de los microorganismos más afectados son las microalgas, las cuales son la base de las cadenas tróficas, por lo que estos productos tienen como consecuencia un gran daño a los ecosistemas acuáticos. Además, se ha observado que los factores físicos del ambiente pueden causar cambios en el metabolismo de los microorganismos haciéndolos más susceptibles a los efectos tóxicos de estos contaminantes.

En la presente investigación se evaluaron en primer lugar los efectos negativos del triclosán sobre el microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard y finalmente la interacción de estos efectos con el incremento de la temperatura. Para ello se realizaron medidas de tres parámetros distintos: crecimiento, viabilidad y contenido en pigmentos. Se obtuvieron descensos significativos de estos parámetros a las 72 horas de exposición al triclosán que indican su toxicidad contra el microalga y se observaron diferentes tipos de interacciones entre la temperatura y el triclosán.

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, contaminante, microalga, temperatura, toxicidad, triclosán.

RESUMO

A produción de medicamentos e produtos para a hixiene aumentou considerablemente nos últimos anos. En consecuencia, os análises químicos de augas superficiais detectan cada ano concentracións maiores de estas sustancias. A maioría de produtos farmacéuticos chegan as augas doces a través das EDAR, onde non poden ser eliminados por completo. Algúns de eles, como o triclosán, son coñecidos polo seu frecuente uso coma antimicrobiano. Cando este tipo de sustancias cando son liberadas ao medio ambiente supoñen un perigo potencial para a estabilidade dos ecosistemas. Un dos microorganismos mais afectado son as microalgas, as cales son a base das cadeas tróficas, causando un gran dano aos ecosistemas acuáticos. Ademais, observouse que os factores físicos do ambiente poden causar cambios no metabolismo dos microorganismos facéndoos mais susceptibles aos efectos tóxicos de estes contaminantes.

Na presente investigación avalouse en primeiro lugar os efectos negativos do triclosán sobre o microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard e finalmente a interacción de estes efectos con o incremento da temperatura. Para elo realizáronse medidas de tres parámetros distintos: crecemento, viabilidade e contido en pigmentos. Obtivéronse descensos significativos de estes parámetros ás 72 horas de exposición ao triclosán que indican a súa toxicidade

contra o microalga e obtivéronse diferentes tipos de interaccións entre a temperatura e o triclosán

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*, contaminante, microalga, temperatura, toxicidade, triclosán.

ABSTRACT

The production of medicines and hygiene products has increased considerably in the past years. Consequently, chemical analysis of surface waters detect higher concentrations of these substances every year. Most pharmaceutical products reach the fresh water through the WWTP, where they can not be completely eliminated. Some of them, such as triclosan, are known for their frequent use as an antimicrobial. When these types of substances are released into the environment, they pose a potential danger to the stability of ecosystems. One of the most affected microorganisms are microalgae, which are the basis of trophic chains, so these products have a great impact on aquatic ecosystems. In addition, it has been observed that the physical factors of the environment can cause changes in the metabolism of microorganisms making them more susceptible to the toxic effects of these pollutants.

In the present investigation, the negative effects of triclosan on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard were evaluated first. And finally was evaluated the interaction of these effects with the increase in temperature. For this reason, measurements of three different parameters were made: growth, viability and pigment content. Significant decreases in these parameters were obtained after 72 hours of exposure to triclosan, indicating their toxicity against microalgae, and different types of interactions between temperature and triclosan were observed.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, pollutant, microalgae, temperature, toxicity, triclosan.

INTRODUCCIÓN

La primera vez que se detectó la presencia de productos farmacéuticos en los medios acuáticos fue en la década de los 70 (Santos *et al.*, 2010). En el año 2002, el mercado solo de antibióticos movilizaba entre 10.000 y 200.000 toneladas de antibióticos al año en todo el mundo (Wise, 2002). A día de hoy, el uso y producción de productos antimicrobianos todavía sigue en aumento, lo cual deriva en el incremento de su concentración en el medio ambiente y, sobre todo, en los sistemas acuáticos (da Rocha *et al.*, 2018). En consecuencia, en los últimos años se han realizado un gran número de análisis químicos para detectar y cuantificar estos contaminantes, así como numerosas investigaciones ecotoxicológicas, con el objetivo de conocer cómo estos contaminantes pueden llegar a afectar a los ecosistemas acuáticos (Kümmerer, 2009).

El presente estudio, se centra en el triclosán (TCS), un agente antimicrobiano usado ampliamente en productos de higiene personal (PCPs: *Personal Care Products*), tales como jabones, detergentes, champús, dentífricos, etc. (Xin *et*

al., 2018). Los PCPs pueden llegar a los ambientes acuáticos por vías muy diversas: excreciones humanas, medicamentos liberados directamente al medio ambiente, residuos de prácticas ganaderas y agrícolas... siendo la principal fuente de origen las aguas efluentes de las estaciones de depuración de aguas residuales (EDAR) (Mandaric *et al.*, 2017). Debido a su diseño actual, las EDAR no son capaces de eliminar todos los residuos farmacéuticos, por lo que los estudios analíticos realizados en aguas superficiales muestran concentraciones de estos productos que oscilan entre los ng L^{-1} y los $\mu\text{g L}^{-1}$ (Castiglioni *et al.*, 2005). En concreto, para el contaminante objeto de este estudio, el TCS, se han estimado concentraciones en los efluentes de las EDAR en el rango de $0.027 - 2.7 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en aguas superficiales se han detectado cantidades máximas del orden de $2.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Chalew & Halden, 2009). Además, debido a la liberación constante de efluentes procedentes de estas estaciones sobre aguas dulces, los PCPs pueden ser considerados contaminantes persistentes (Mandaric *et al.*, 2017). Esto supone un potencial peligro para los ecosistemas acuáticos, ya que se ha observado que pequeñas concentraciones pueden producir toxicidad crónica sobre diferentes organismos como bacterias, diatomeas, clorofíceas, peces... (Rosal *et al.*, 2010).

Aunque el TCS es usado principalmente por sus capacidades como bactericida, recientes estudios han demostrado que no solo presenta toxicidad contra bacterias, sino que otros organismos como las algas unicelulares y, en particular, las clorofíceas, presentan cierta sensibilidad a este contaminante (Orvos *et al.*, 2002). Todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de acción tóxica que el TCS ejerce sobre las microalgas. No obstante, algunos estudios sugieren que sus efectos podrían ser similares a los que tiene sobre las bacterias, llegando a apuntar algunos autores, que las propias microalgas son más sensibles a este contaminante (Proia *et al.*, 2013).

Las microalgas son el primer nivel de las cadenas tróficas acuáticas, captando CO_2 y proporcionando energía y oxígeno al resto de niveles. El hecho de que jueguen un papel importante en el mantenimiento del balance de materia y del ciclo de energía de los ecosistemas acuáticos, las convierte en excelentes indicadores de los efectos perjudiciales que puede producir un contaminante en las aguas superficiales (Yu *et al.*, 2018). Por esta razón y por ciertas características, como su ciclo de vida corto, se ha elegido *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard como organismo modelo para este trabajo (Melegari *et al.*, 2013).

Los diferentes organismos que habitan los ecosistemas acuáticos no solo tienen que hacer frente al peligro de la presencia de un único contaminante, también pueden verse afectados por la combinación de múltiples productos tóxicos. Además, las condiciones ambientales de estos ecosistemas no son estáticas; las constantes variaciones de temperatura, pH, salinidad, intensidad de luz y demás factores, pueden provocar alteraciones fisiológicas a nivel celular y molecular que en combinación al potencial efecto tóxico de los contaminantes acuáticos pueden generar interacciones combinadas (Boeckman & Bidwell, 2006). Si los efectos combinados de ambos factores de estrés son mayores que la suma de los individuales, la interacción se define como sinérgica, mientras que, si son menores, se define como antagónica (Galic *et al.*, 2018). Sin embargo, los ensayos ecotoxicológicos tradicionalmente se han planteado bajo unas condiciones ambientales

determinadas, las óptimas para el crecimiento de los organismos. Dado que estos ensayos no reflejan la realidad de los organismos en el ambiente, y menos en el contexto del cambio climático, es importante realizar ensayos multifactoriales en lo que se describan las interacciones entre factores químicos y factores abióticos (Bindesbøl *et al.*, 2005).

OBJETIVO

El objetivo general de este proyecto es estudiar el potencial efecto tóxico del TCS sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii*, así como estudiar la potencial interacción entre un incremento de la temperatura y la toxicidad de este contaminante.

Para evaluar el grado de toxicidad del TCS, se utilizarán los siguientes parámetros clásicamente empleados en ensayos de toxicidad con microalgas:

- » Densidad celular y tasa de crecimiento.
- » Contenido celular de clorofila *a*, de clorofila *b* y carotenoides.
- » Viabilidad celular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de la especie microalgal

La especie utilizada en este estudio es *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (Fig. 1). Es un microalga verde ampliamente distribuida en medios acuáticos dulceacuícolas, perteneciente a la división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia Chlamydomonaceae (Bold & Wynne, 1985). Esta alga ha comenzado a utilizarse como modelo ecotoxicológico de los ecosistemas de agua dulce debido a su alta sensibilidad a los contaminantes y a su rápida respuesta al estrés medioambiental (da Costa *et al.*, 2016). Otra de las ventajas de este microorganismo es que se ha secuenciado su genoma al completo por lo que es un organismo idóneo para la manipulación genética y estudios de expresión génica (Domingos *et al.*, 2011).

C. reinhardtii (Fig.1) es un alga unicelular con forma de esferoide de aproximadamente 10 µm de diámetro, que contiene todos los orgánulos eucarióticos estándar. Una importante fracción de su citoplasma está ocupada por un único cloroplasto en forma de copa, en el que se produce la captura de la luz y la fotosíntesis. Hacia el ecuador celular se encuentra el “punto ocular”, un orgánulo rudimentario sensible a la luz que la célula utiliza para realizar fototaxis; hacia el ápice celular pueden observarse dos vacuolas contráctiles. Como en la mayoría de protistas dulceacuícolas, las vacuolas están implicadas en la regulación de la presión intracelular, expulsando periódicamente el exceso de agua que ingresa en la célula por ósmosis. Cerca de las vacuolas contráctiles se localizan dos cuerpos basales, de cada uno de los cuales parte un único flagelo de 10-12 µm de longitud. El cuerpo de la célula está encerrado en una pared celular de alrededor de 200 nm de espesor, compuesta por 7 capas distintas formadas principalmente por glicoproteínas y se caracterizan

por la ausencia de celulosa. Las células vegetativas de *C. reinhardtii* son haploides y pueden reproducirse indefinidamente en este estado; esta reproducción asexual tiene un ciclo de aproximadamente un día (Jeanneret *et al.*, 2016).

C. reinhardtii ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la fotosíntesis eucariótica debido a su capacidad de mantener un aparato fotosintético funcional durante el crecimiento en oscuridad. También se emplea como modelo para comprender, tanto las funciones del flagelo eucariótico y del cuerpo basal, como los efectos deletéreos debidos a su disfunción. Recientemente, se están investigando aplicaciones para esta microalga en el campo de la biorremediación y la producción de biocombustibles (Merchant *et al.*, 2007).

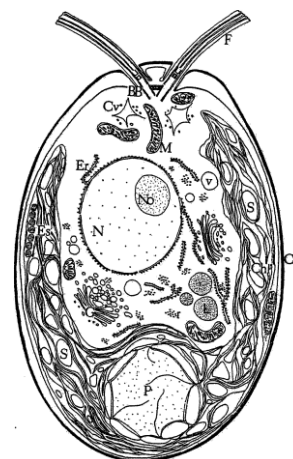


Figura 1.
Representación de una célula de *C. reinhardtii* (Tomada de Harris, 2001).

Triclosán

El contaminante en el que se centra el presente trabajo es el antimicrobiano conocido como triclosan (TCS; 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter).

El TCS (Fig. 2) tiene apariencia de polvo cristalino grisáceo, inodoro e insípido. Presenta un peso molecular de 289.5 g mol^{-1} , un punto de fusión de $57 \pm 1^\circ\text{C}$ (Bhargava & Leonard, 1996) y un $\text{pK}_a = 8.1$ (Orvos *et al.*, 2002). El TCS presenta una baja solubilidad en agua, es moderadamente soluble en disoluciones alcalinas y fácilmente soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos (Schweizer, 2001).

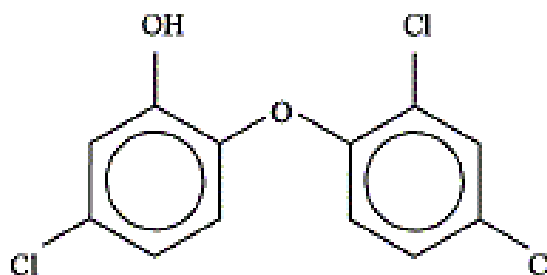


Figura 2. Molécula de TCS (Tomada de Adolfsson-Erici *et al.*, 2002).

El TCS es un agente antibacteriano de amplio espectro, empleado en todo mundo por su alta seguridad para la salud y eficacia antimicrobiana (Jones *et al.*, 2000). Fue utilizado por primera vez hace aproximadamente 50 años, aumentando su uso en los últimos 35 años, hasta el punto de que, en los años 90, la mayoría de los productos antibacterianos ya contienen TCS como ingrediente activo (Dann & Hontela, 2011).

Su actividad inhibidora del crecimiento se debe al bloqueo de la síntesis de lípidos, concretamente, a la inhibición específica de una reductasa de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP; *enoyl-acyl carrier protein*) NADH-dependiente (Russell, 2004).

Cultivo microalgal

La cepa empleada en los experimentos (CCAP 11/32A; mt+) se ha obtenido a partir de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*) del Laboratorio Marino de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido).

Los cultivos se realizaron en medio tris-acetato fosfato (TAP; *tris-acetate-phosphate*) mínimo, sin fuente de carbono, y con nitrato como fuente de nitrógeno en vez de amonio (Harris, 2009) preparado con agua bidestilada y esterilizado en un autoclave a 120 °C durante 20 min. A este medio se le añadieron, en asepsia, 3 mL de una disolución *stock* de oligoelementos por cada litro de cultivo. La disolución *stock* de oligoelementos fue preparada diluyendo 0.5 g de Algal (Algal, Nutrición Avanzada S.A) en 100 mL de agua destilada, y se mantuvo en una nevera a 4°C.

Los cultivos *stock* (de 300 mL de volumen) se realizaron en botellas Pyrex de 500 mL de capacidad y se mantuvieron dentro de una cámara con condiciones controladas de fotoperiodo, aireación, temperatura y luz. El proceso de aireación se basó en el insuflado de aire atmosférico mediante un tubo turbosoplador a un flujo de constante de 10 L min⁻¹, al final del cual se sitúa un filtro Milipore FG de 0.22 µm de diámetro de poro para mantener las condiciones de axenicidad. En cuanto a las condiciones de temperatura y luz, la cámara se mantuvo a 19±1°C, fijándose la intensidad lumínica a 70 µmol fotón m⁻² s⁻¹, con un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 h mediante tubos fluorescentes Philips TDL de 36 W.

En las diferentes experiencias se emplearon tubos *Kimax* con 60 mL de cultivo y una densidad celular inicial de 1.5x10⁵ células mL⁻¹ obtenida a partir de un inóculo en fase de crecimiento exponencial.

Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar la interacción entre la toxicidad del TCS en el microalga *C. reinhardtii* y la variación de la temperatura ambiental, los ensayos se realizaron a dos temperaturas diferentes, 19±1°C y 27±1°C, con una duración de 72 h. Todos los experimentos siguieron la misma metodología con la única variante de que el grupo de experimentos a 19±1°C se mantuvo en una misma cámara que los cultivos *stock* y los experimentos a 27±1°C en otra diferente, aunque con las mismas características de fotoperiodo, aireación y luminosidad.

Los cultivos se realizaron en tubos *Kimax* con 60 mL de cultivo y diferentes concentraciones de TCS. Las diferentes concentraciones de TCS se obtuvieron a partir de diferentes volúmenes de una solución *stock* de TCS a 4 mg L⁻¹ en metanol al 50%, por lo que también se realizó un control sin metanol y sin TCS y un control con metanol y sin TCS. Todos los cultivos se llevaron a una concentración de metanol final de 0.18%. Las diferentes concentraciones de TCS fueron: 0.1 mg L⁻¹, 0.25 mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹. Cada uno de los 6 tratamientos se realizó siempre por duplicado y los cultivos se dispusieron al azar en la cámara de incubación. Las medidas de los diferentes parámetros estudiados fueron realizadas a las 72 horas del inicio de la incubación.

Determinación de la densidad celular

La densidad celular se determinó a las 0 h y a las 72 h de exposición mediante recuentos celulares de cada uno de los 6 tratamientos y sus réplicas. El conteo se efectuó en una cámara Neubauer examinada bajo un microscopio óptico de contraste de fases NIKON *Eclipse E400* (Nikon, Japón). Las diferentes alícuotas se fijaron previamente con lugol debido a la alta movilidad de las células.

Con los datos de los conteos se calculó la tasa de crecimiento (T_c) mediante la fórmula siguiente:

$$T_c = \frac{\ln(N_f) - \ln(N_0)}{\ln 2 (t_f - t_0)}$$

En esta fórmula, T_c es la tasa de crecimiento en días^{-1} , N_f y N_0 son las densidades finales e iniciales en células mL^{-1} y t_f y t_0 son el tiempo final e inicial en días.

Determinación de clorofilas a, clorofilas b y carotenoides

Para realizar la determinación espectrofotométrica de pigmentos fotosintéticos, se retiraron 2 alícuotas de 10 mL de cada uno de los cultivos en tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron en una centrífuga con refrigeración *Multifuge 3L-R Heraeus* a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se elimina el sobrenadante de cada tubo mediante aspiración con una bomba de vacío y pipeta Pasteur; se resuspende el pellet celular de los tubos en 3 mL de una disolución de acetona al 90%. Los tubos se guardan en una nevera a 4°C durante 24 horas antes de realizar las medidas, envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz. Pasado el tiempo suficiente para que los pigmentos se extraigan, se procede a su centrifugación de nuevo, eliminando así los restos celulares. A continuación, se procede a medir la absorbancia de los sobrenadantes en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-160A*. Para realizar las medidas de absorbancia se emplearon cubetas de cuarzo, frente a un blanco de acetona al 90%.

Para realizar el cálculo de los distintos pigmentos se usaron las siguientes fórmulas (Jeffrey and Humphrey, 1975) donde las concentraciones de pigmentos se obtienen en $\mu\text{g mL}^{-1}$:

$$[\text{Clorofila } a] = 11.93A_{664} - 1.93A_{647}$$

$$[\text{Clorofila } b] = 11.93A_{664} - 1.93A_{647}$$

$$[\text{Carotenoides}] = A_{480}$$

Determinación de la viabilidad celular

Por último, se evaluó la viabilidad celular de los cultivos microalgales expuestos al contaminante TCS. Para distinguir las células viables de las células no viables se realizó el ensayo de la hidrólisis enzimática del compuesto fluorogénico diacetato de fluoresceína (FDA; *fluorescein diacetate*). El diacetato de fluoresceína es un compuesto orgánico fluorogénico conocido por su capacidad indicadora de la viabilidad celular en una gran variedad de tipos celulares, tanto procariotas como eucariotas. Es una molécula lipofílica, sin

carga y no fluorescente que penetra fácilmente a través de las membranas celulares gracias a estas propiedades. Una vez en el interior de la célula, las esterasas inespecíficas citoplasmáticas actúan hidrolizando los enlaces éster de los grupos acetato con la fluoresceína. El anión fluoresceína libre produce fluorescencia y no tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares, por lo que queda retenido en las células con las membranas intactas. Las células que presenten viabilidad tendrán capacidad esterasa, por lo que, al ser excitadas con luz azul (490 nm), emitirán fluorescencia en torno de 525 nm de longitud de onda (Humphrey *et al.*, 1994).

Para realizar dicho análisis son necesarias alícuotas de 1 mL de cada una de las réplicas, con una concentración de entre 2×10^5 y 4×10^5 células·mL⁻¹. Veinte minutos antes de la medida se añaden a cada muestra 7.5 µL de una solución de FDA de 50 µg·mL⁻¹ de concentración en dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez transcurridos los 20 minutos, se realiza un conteo en una cámara Neubauer a través de un microscopio de fluorescencia *Nikon Eclipse E600* equipado con una lámpara de mercurio, utilizando un filtro de excitación entre 450-490 nm de longitud de onda y un filtro barrera LP (Long-Pass) de 520 nm de longitud de onda. En cada muestra se analizan 50 células al azar y los resultados se expresan en porcentaje de células viables (FDA+) frente al total de células analizadas.

Cálculo de la EC50

Con los resultados de las experiencias realizadas se procede a calcular la EC₅₀ para los parámetros tasa de crecimiento y viabilidad. La EC₅₀ se define como la concentración de sustancia tóxica (en este caso TCS) a la cual se produce un 50% de inhibición del parámetro estudiado con respecto a los valores control. Para calcular los valores de EC₅₀ se utilizó el programa informático Compusyn (versión 1.0.1) con valores de confianza del 95%.

El porcentaje de inhibición se calculó a partir de los datos obtenidos para cada una de las experiencias mediante la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(\text{Control} - \text{Tratamiento})}{\text{Control}} \right] \times 100$$

Análisis estadístico

Para realizar el tratamiento de los datos y los correspondientes análisis estadísticos se han usado los programas Excel 2016 y el software IBM SPSS Statistics (versión 21.0, SPSS, IBM).

Con Excel 2016 se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada una de los tratamientos y controles. Con el software IBM SPSS Statistics (versión 21.0, SPSS, IBM) se estudiaron dos hipótesis diferentes para cada uno de los parámetros analizados en esta investigación.

La primera hipótesis, “la concentración de TCS no afecta al parámetro medido en el cultivo microalgal”, fue evaluada mediante la comparación de las medias con un test ANOVA de un solo factor. Se estableció un α de 0.05 en todos los casos. Para poder determinar que medias difieren y así crear diferentes subconjuntos de datos con similitud significativa entre ellos se realizó una Prueba de Tukey (Post-hoc).

La segunda hipótesis, “no existe interacción entre la concentración de TCS y el incremento de la temperatura”, se analizó mediante el procedimiento modelo lineal general univariante. Se estableció un α de 0.05 en todos los casos. Se utilizaron como factores fijos la temperatura del ambiente y la concentración de TCS y se analizó como variable dependiente los distintos parámetros obtenidos durante las experiencias.

Todas las gráficas se realizaron con Excel 2016 y se han representado los resultados obtenidos como medias con sus correspondientes desviaciones estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración del metanol

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre el control y el control con metanol para ninguno de los parámetros medidos (datos no mostrados; $p > 0.05$). Esto indica que el efecto del metanol en los diferentes parámetros medidos es nulo o despreciable. Por este motivo, en todas las gráficas y comparaciones hechas en este estudio solo se ha usado el control con metanol (M) y las diferentes concentraciones de TCS.

Efecto de la exposición a triclosán sobre el crecimiento celular en cultivos de *C. reinhardtii*

Para las experiencias realizadas a 19°C de temperatura, la exposición al contaminante TCS provocó un descenso en las tasas de crecimiento con respecto a las obtenidas en los cultivos control, observándose tasas de crecimiento decrecientes a medida que aumenta la concentración de TCS (Fig. 3). Además, a la concentración más alta ensayada, 1 mg L⁻¹ de TCS, la tasa de crecimiento obtenida fue 0. Estos resultados indican que el TCS produce un efecto negativo dependiente de la concentración sobre el crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii*, alcanzándose una concentración a la cual se inhibe por completo el crecimiento celular.

Tratando los datos con un test ANOVA de un solo factor y mediante la Prueba de Tukey, se dividieron los grupos en diferentes subconjuntos, representados por diferentes letras, incluyendo en cada subconjunto aquellos datos en los que la diferencias no hayan sido estadísticamente significativas ($p > 0.05$). A la temperatura de 19°C se observan diferencias significativas en todos los tratamientos con respecto al control salvo a la concentración de 0.1 mg L⁻¹.

Para las experiencias realizadas a 27°C (Fig. 4), se obtuvieron tasas de crecimiento menores en los cultivos de *C. reinhardtii* a medida que se incrementa la concentración de TCS en el medio. El cultivo sometido a 0.1 mg L⁻¹ tiene un valor de T_c mayor que el control, si bien dicho incremento no es estadísticamente significativo ($p > 0.05$). Este resultado puede deberse a un fenómeno de hormesis. De este modo, a bajas concentraciones (0.1 mg L⁻¹) se produce una estimulación del crecimiento; mientras que, a concentraciones superiores se produce el efecto contrario. Esta inhibición del crecimiento es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a partir de concentraciones superiores a

0.25 mg L⁻¹, lo cual, como en la experiencia a 19°C, indican un efecto inhibitorio del TCS en el crecimiento celular dependiente de la concentración.

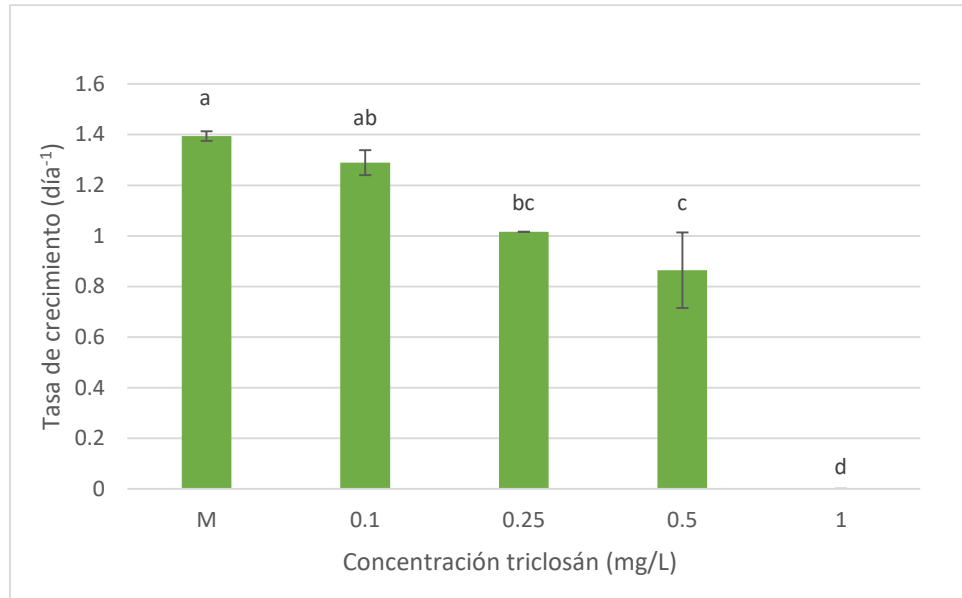


Figura 3. Tasas de crecimiento, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 horas de exposición al antibiótico TCS a 19°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios \pm la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0.05$).

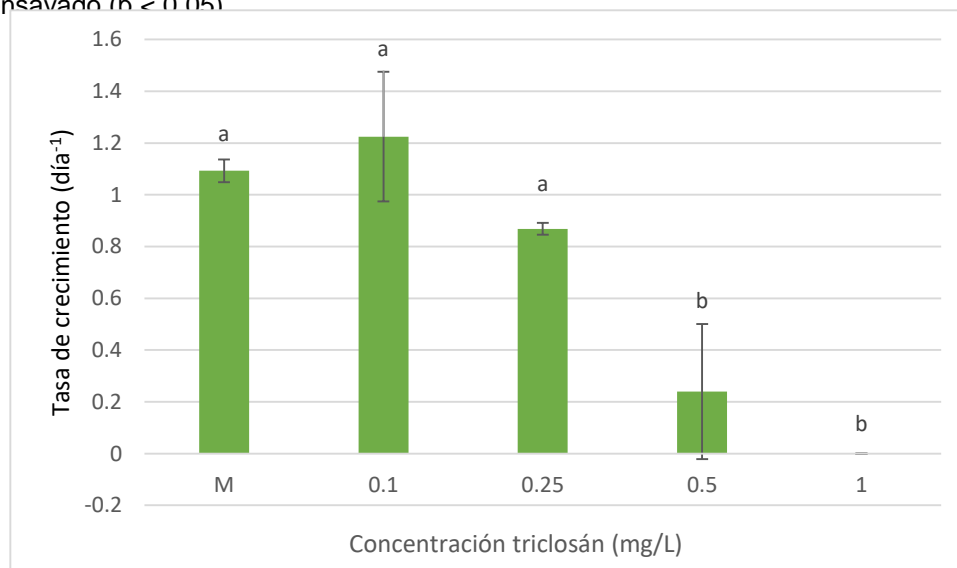


Figura 4. Tasas de crecimiento, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 horas de exposición al antibiótico TCS a 27°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios \pm la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0.05$).

Como se ha visto en otros estudios como los de González-Pleiter *et al* (2017) o los de Pan *et al.* (2018), el aumento de la concentración de TCS conlleva una disminución en las densidades celulares, lo que se traduce en una disminución de la tasa de crecimiento.

Las EC_{50} obtenidas para 19°C y 27°C fueron 0.22 y 0.32 mg L⁻¹ respectivamente. Otros estudios similares han obtenido valores para EC_{50} con *C. reinhardtii* expuesta a otros contaminantes y productos farmacéuticos detectados en aguas superficiales: 1.85 ± 0.41 mg L⁻¹ para la benzofenona-3 (Mao *et al.*, 2017), 1381 ± 286 mg L⁻¹ para el ibuprofeno, 1776 ± 312 mg L⁻¹ para el diclofenaco, 2286 ± 16 mg L⁻¹ para el paracetamol, 660 ± 0.5 mg L⁻¹ para el ácido salicílico (Pino *et al.*, 2016) y 51.9 ± 1.0 mg L⁻¹ para el ácido perfluorooctanoico (Hu *et al.*, 2014). El TCS, respecto a estas otras sustancias, presenta valores comparativamente bajos, lo que indica una elevada toxicidad y riesgo para *C. reinhardtii* y posiblemente, por ello, para los ecosistemas acuáticos. Esto último se confirma con otros estudios que calcularon las EC_{50} del TCS en otras especies de microorganismos típicos de las aguas dulces. Algunos resultados son: 0.668 mg L⁻¹ en la bacteria Gram (-) *Vibrio fischeri* 0.007 mg L⁻¹ en el micro alga *Raphidocelis subcapitata* (Gorenoglu *et al.*, 2018), 0.324 mg L⁻¹ en la diatomea *Cymbella* sp. (Ding *et al.*, 2018a) y 0.145 mg L⁻¹ en la diatomea *Navicula* sp. (Ding *et al.*, 2018b).

Puede observarse que todas estas especies presentan valores de EC_{50} del mismo orden de magnitud que *C. reinhardtii*. Este hecho nos sugiere que el TCS puede afectar a multitud de microorganismos a bajas concentraciones, suponiendo una amenaza para la base de las cadenas tróficas de los ecosistemas acuáticos.

Para comprobar si existe interacción entre la temperatura y la concentración de TCS se realizó un procedimiento modelo lineal general univariante

En primer lugar, no se observaron diferencias significativas entre los controles de ambas temperaturas. Además, existe una relación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre ambos factores (concentración TCS y temperatura), indicando que la temperatura tiene algún efecto sobre el mecanismo de acción del contaminante. A la vista de los resultados obtenidos parece tratarse de una interacción antagónica. En las tasas de crecimiento a 27°C no se observaron cambios en las concentraciones más bajas, al contrario que en los ensayos a 19°C. Por último, analizando los resultados de los valores de EC_{50} se observa una mayor sensibilidad a la temperatura más baja ensayada.

Con respecto a la interacción entre contaminante y temperatura se han observado fenómenos relacionados con la temperatura y el crecimiento celular en otros estudios. La disminución de la temperatura por debajo del óptimo de la especie aumenta la sensibilidad al TCS (Xin *et al.*, 2018). La baja temperatura podría reducir la actividad enzimática, ralentizando la tasa metabólica y debilitando la resistencia al TCS (Xin *et al.*, 2018). También se observado que el aumento de la temperatura por encima de un valor determinado genera la disminución del crecimiento de los cultivos (Kirrolia *et al.* 2012).

Efecto de la exposición a triclosán sobre la viabilidad celular en cultivos de *C. reinhardtii*

Atendiendo a los resultados obtenidos en los cultivos microalgales expuestos al contaminante TCS (Tabla 1) se observa en todos los tratamientos una disminución de la viabilidad celular, si bien en los cultivos expuestos a 19°C dicho descenso no es estadísticamente significativo ($p > 0.05$). A la temperatura de 27°C se observan diferencias significativas con respecto al control a las concentraciones de 0.5 y 1 mg L⁻¹. Esto indica, por lo tanto, un efecto sobre la viabilidad celular dependiente de la concentración.

Concentración TCS (mg/L)	19°C	27°C
	Viabilidad celular (%)	Viabilidad celular (%)
M	94 ± 2.83 ^a	81 ± 26.87 ^{ab}
0.1	97 ± 4.24 ^a	92 ± 0 ^a
0.25	91 ± 1.41 ^a	78 ± 16.97 ^{ab}
0.5	81 ± 15.56 ^a	30 ± 8.49 ^{bc}
1	76 ± 2.83 ^a	17 ± 1.41 ^c

Tabla 1. Efecto del TCS en la viabilidad de las células de *C. reinhardtii* tras 72 horas a 19°C y 27°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios ± la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0,05$).

Los valores de EC₅₀ calculados para los ensayos de viabilidad celular para 19 y 27°C fueron de 3.54 y 0.69 mg L⁻¹, respectivamente. Esto indica que hay mayor efecto en la viabilidad celular a mayor temperatura. Comparado con las EC₅₀ obtenidas en el crecimiento, observamos el efecto inverso, en las cuales existía mayor sensibilidad a 19°C. Esto puede deberse a que en los contajes de crecimiento se cuentan también las células muertas, es decir, aunque exista una densidad celular mayor a 27°C el porcentaje de células no viable sería mayor.

Al estudiar si existe interacción entre el TSC y la temperatura se observó la existencia de una interacción entre ambas magnitudes ($p < 0.05$), dado que a la temperatura más alta se produce un descenso significativo de la viabilidad celular al aumentar la concentración de TCS en el medio de cultivo microalgal.

La reducción en la viabilidad celular causada por el TCS ha sido anteriormente descrita en otras especies de protozoos como el parásito *Perkinsus marinus* (Lund *et al.*, 2005) y *Tetrahymena thermophila* (Gao *et al.*, 2015). Un estudio realizado sobre el efecto letal del TCS en células madre neuronales de ratas relacionó la muerte celular provocada por el TCS con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; *reactive oxygen species*) (Park *et al.*, 2016). El equilibrio entre la producción de ROS y la neutralización de antioxidantes mantiene la homeostasis celular y previene el daño celular. Cuando el TCS altera el estado redox celular, genera un estrés oxidativo que conduce al daño oxidativo de muchos componentes celulares, iniciando eventualmente la activación de procesos relacionados con la muerte celular (Park *et al.*, 2016). Esto se ve respaldado por los resultados que obtuvo

González-Pleiter *et al.* (2017) en los que se detectó la formación de estos compuestos. Sin embargo, en otros experimentos como los realizados por Almeida *et al.* (2017) no se detecta la formación de ROS en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a TCS. Estos resultados indicarían que el TCS también puede afectar a la viabilidad de *C. reinhardtii* mediante el mismo mecanismo observado en bacterias y descrito en material y métodos.

Existen otros fluorocromos, como la hidroetidina (HE), y otros métodos, como la citometría de flujo, utilizados en los ensayos de viabilidad celular. Realizar estos ensayos en futuras experiencias podría ser interesante para comparar y contrastar los resultados, así como, poder detectar otros parámetros como la actividad metabólica o la producción de ROS. Las medidas efectuadas en citometría de flujo tienen la ventaja de poder detectar cambios menores en el metabolismo mediante pequeños cambios en la fluorescencia o realizar análisis in vivo (Jochem, 1999). Se ha observado que las células pueden pasar por fases transitorias en la que la intensidad de la fluorescencia es aparentemente baja debido a cambios fisiológicos. Además, se ha comprobado que de la señal del FDA puede sufrir desvanecimiento en tiempos relativamente cortos (Garvey *et al.*, 2007). Estos dos efectos pueden dar lugar al conteo de células vivas como células muertas. También puede dársele situación contraria, en la que células muertas se cuenten como vivas debido a la autofluorescencia propia de las células, producida por la clorofila (Garvey *et al.*, 2007).

Efecto de la exposición a triclosán sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos celular en cultivos de *C. reinhardtii*

Finalmente, se estudió el potencial efecto tóxico del TCS sobre la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides) producidos por célula en cultivos de *C. reinhardtii*.

A 19°C de temperatura (Fig. 5) solo se observaron diferencias significativas respecto al control en las concentraciones de 0.1 mg L⁻¹, en la que se observa un aumento en la cantidad de pigmentos y 1 mg L⁻¹, donde se observa una disminución ($p < 0.05$). Estos datos indicarían un fenómeno de hormesis a esta temperatura de incubación y demuestran que el aumento de la concentración de TCS disminuye la producción de clorofila *a*. Sin embargo, a 27°C (Fig. 5), no existen diferencias significativas entre los diferentes valores excepto a la concentración de 1 mg L⁻¹ donde se observa que la concentración celular de clorofila alcanza valores próximos a cero.

En cuanto a la clorofila *b*, a 19°C (Fig. 6), se obtienen diferencias significativas ($p < 0.05$) en todas las concentraciones menos a 0.5 mg L⁻¹ ($p < 0.05$). Con estos datos se puede concluir que vuelve a existir relación entre la producción de este pigmento y la concentración del bactericida y se observa de nuevo un fenómeno de hormesis a las concentraciones más bajas ensayadas. En el análisis de clorofila *b* tampoco se encuentran diferencias significativas en los valores obtenidos a 27°C (Fig. 6) salvo entre el tratamiento a 1 mg L⁻¹ y los tratamientos a 0.1 y 0.25 mg L⁻¹.

Los resultados obtenidos en la determinación celular de carotenoides a 19°C (Fig. 7) indican que solo existen diferencias significativas con el control a las concentraciones de 0.1 mg L⁻¹, donde se observa un aumento, y a 1 mg L⁻¹, donde no existe producción de pigmentos. Por lo tanto, como en los anteriores análisis de pigmentos se observa un fenómeno de hormesis a 0.1 mg L⁻¹ y una inhibición completa a 1 mg L⁻¹.

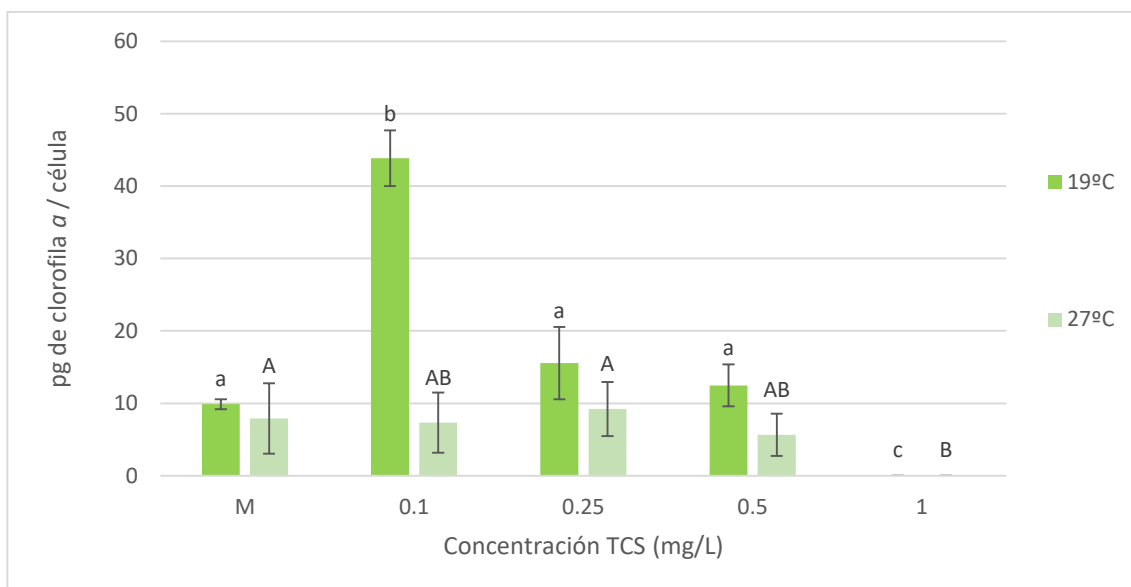


Figura 5. Concentración de clorofila *a* por célula, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 horas de exposición al antibiótico TCS a 19°C y 27°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios \pm la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0.05$) usando las minúsculas para los datos tomados a 19°C y mayúsculas para los tomados a 27°C.

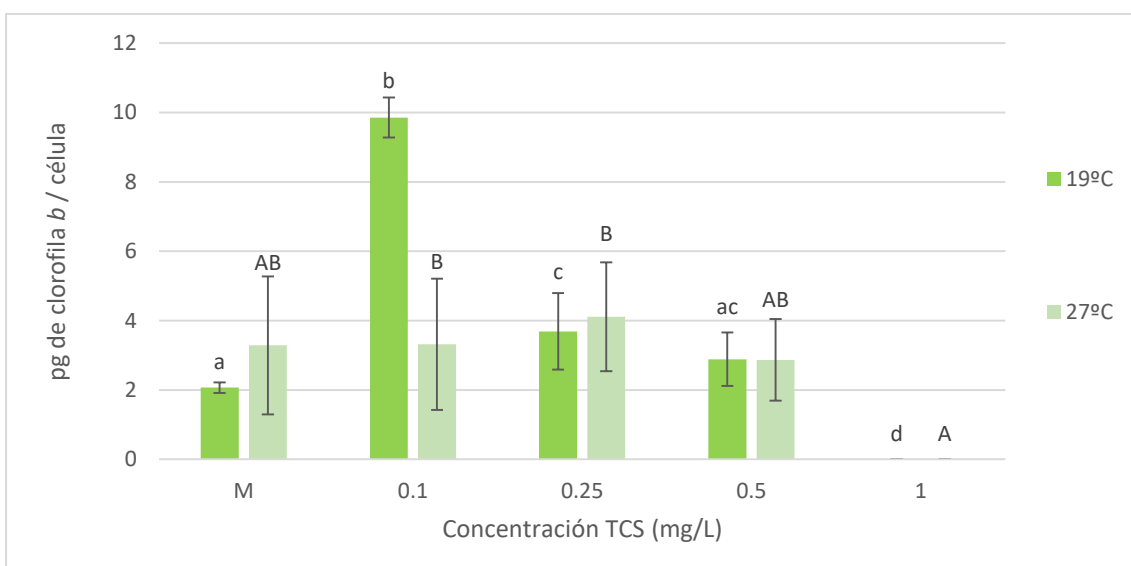


Figura 6. Concentración de clorofila *b* por célula, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 horas de exposición al antibiótico TCS a 19°C y 27°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios \pm la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0.05$) usando las minúsculas para los datos tomados a 19°C y mayúsculas para los tomados a 27°C.

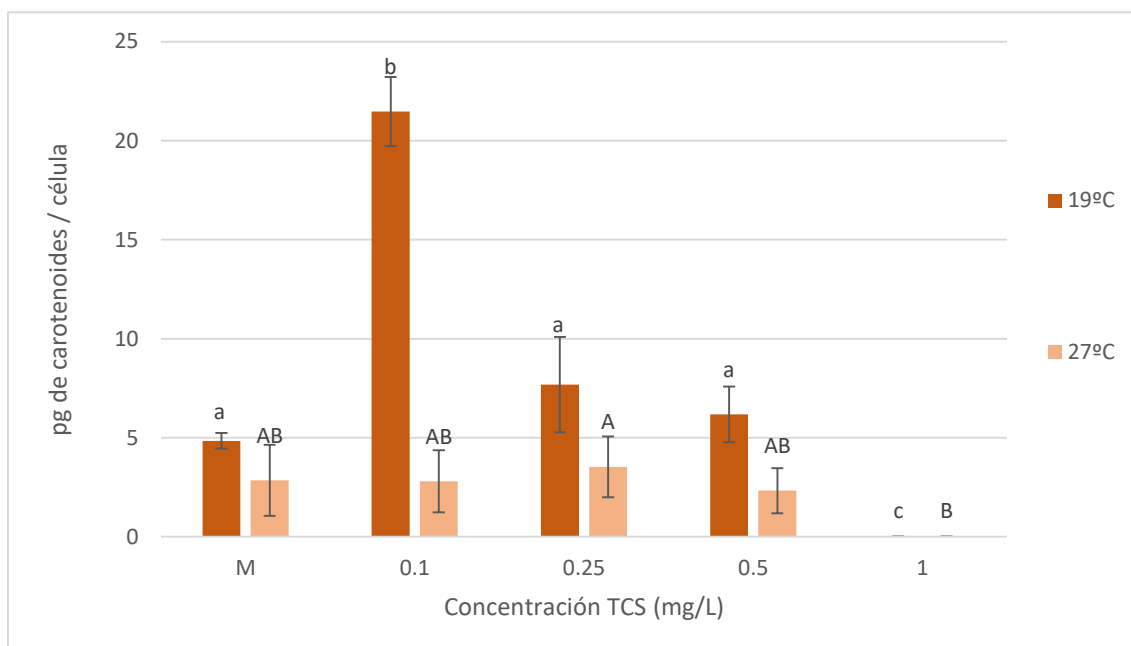


Figura 7. Concentración de carotenoides por célula, en cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 horas de exposición al antibiótico TCS a 19°C y 27°C. Los datos mostrados se corresponden con los valores medios \pm la desviación estándar. M corresponde al control con metanol. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ensayado ($p < 0.05$) usando las minúsculas para los datos tomados a 19°C y mayúsculas para los tomados a 27°C.

Para los tres pigmentos fotosintéticos la hipótesis “no existe interacción entre la concentración de TCS y el incremento de la temperatura” se rechaza con un p valor igual a 0.000. Esto indica que la temperatura potencia el efecto del TCS sobre el contenido celular de pigmentos en *C. reinhardtii*.

El aumento de la concentración de pigmentos con respecto al control puede explicarse con una producción de pigmentos en respuesta a bajas concentraciones. En los experimentos realizados por Eriksson *et al.* (2015) se observó que a concentraciones bajas de TCS la cantidad de pigmento disminuye, pero a partir de cierta concentración, la cantidad aumenta notablemente. Este fenómeno se interpretó por los autores como un mecanismo de tolerancia de la microalga contra el TCS. Los niveles de pigmento elevados captarían más energía luminosa, lo que a su vez mantendría el gradiente de pH sobre la membrana de los tilacoides y mitigaría el efecto del TCS (Eriksson *et al.* 2015).

Las disminuciones observadas en el contenido de los pigmentos fotosintéticos pueden estar relacionadas con el daño oxidativo a PSII, con una disminución en el contenido de pigmento o con el blanqueamiento como consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (Seoane *et al.*, 2017)

En la investigación realizada por Ricart *et al.* (2010) se hallaron nuevas pruebas de que el TCS produce daños en el aparato fotosintético. En estas experiencias se observaron los efectos en los mecanismos de extinción no fotoquímicos. El aumento de este mecanismo es consecuencia de la inhibición fotosintética y se produce como medida de protección contra el excedente de

radiación lumínica. A su vez, la disminución detectada en la eficiencia fotosintética puede ser un precursor de un efecto tóxico a nivel estructural (Fai *et al.*, 2007) como alteraciones en la integridad de la membrana, despolarización de la membrana citoplasmática, cambios en el pH... (González-Pleiter *et al.*, 2017).

Mejoras para futuros ensayos

En general, los datos obtenidos presentan desviaciones estándar grandes, mayores al 10% de la media. Aumentar el número de réplicas para cada medida reduce enormemente las desviaciones estándar y aumenta la exactitud de la medida, compensando los datos anómalos y errores en la medida. En futuros ensayos se podría aumentar el número de experimentos, réplicas y alícuotas con el objetivo de reducir las desviaciones estándar.

CONCLUSIONES

La exposición al contaminante TCS tiene un efecto inhibitorio y dependiente de la concentración sobre el crecimiento del microalga *C. reinhardtii* a la temperatura de 19°C a partir de concentraciones iguales o mayores a 0.25 mg L⁻¹. A 27°C, se observa un efecto inhibitorio solamente a concentraciones iguales o superiores a 0.5 mg L⁻¹.

En los ensayos de viabilidad solo se observa una reducción significativa de la misma en las células expuestas a TCS y mantenidas a 27°C de temperatura.

En cuanto al contenido de pigmentos fotosintéticos por célula en los ensayos realizados a la temperatura de 19°C, se observa un aumento significativo en la concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides en los tratamientos de 0.1 mg L⁻¹ y una disminución de la misma en los de 1 mg L⁻¹. Este hecho indica que hay un fenómeno de hormesis. A 27°C únicamente se detecta un descenso significativo en las concentraciones de estos pigmentos a concentraciones de TCS iguales o superiores a 1 mg L⁻¹, donde la concentración de pigmentos tiende a 0.

Finalmente, con respecto a las interacciones entre contaminante y temperatura, se observó que para viabilidad y contenido celular de pigmentos existe una interacción de tipo sinérgico, en la que los efectos del TCS se ven potenciados por los incrementos de la temperatura. Para el crecimiento se determina que existe interacción, pero de tipo antagónico.

CONCLUSIÓNS

A exposición ao contaminante TCS ten un efecto inhibitorio e dependente da concentración sobre o crecemento do microalga *C. reinhardtii* á temperatura de 19 °C a partir de concentracións iguais ou maiores a 0.25 mg L⁻¹. A 27°C, se observa un efecto inhibitorio soamente a concentracións iguais ou superiores a 0.5 mg L⁻¹.

Nos ensaios de viabilidade so observase una redución significativa da mesma nas células expostas a TCS e mantidas a 27°C de temperatura.

En canto ao contido de pigmentos fotosintéticos por célula nos ensaios realizados a la temperatura de 19°C, observase un aumento significativo na concentración de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides nos tratamentos de 0.1 mg L⁻¹ e una diminución da mesma nos de 1 mg L⁻¹. Este feito indica que hai un fenómeno de hormesis. A 27°C unicamente detectase un descenso significativo nas concentracións de estes pigmentos a concentración de TCS iguais ou superiores a 1 mg L⁻¹.

Finalmente, con respecto ás interaccións entre contaminante e temperatura, observouse que para viabilidade e contido celular de pigmentos existe una interacción de tipo sinérxico, na que os efectos do TCS vence potenciados polos incrementos da temperatura. Para o crecemento determinase que existe interacción, pero de tipo antagónico.

CONCLUSIONS

Exposure to the TCS contaminant from concentrations equal to or greater than 0.25 mg L⁻¹ has an inhibitory, concentration-dependent effect on the growth of *C. reinhardtii* microalgae at a temperature of 19°C. An inhibitory effect is observed at 27°C only when concentrations are equal to or greater than 0.5 mg L⁻¹.

A significant reduction of the viability is observed in the cells exposed to TCS and maintained at 27°C.

A significant increase in chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid content per cell was observed at 19°C and 0.1 mg L⁻¹ of TCS. A decrease in the same parameters was observed when TCS concentration reached 1 mg L⁻¹. This result is an indicator of an hormesis phenomenon. A significant decrease in the concentrations of these pigments is detected at 27°C only when TCS concentrations are equal to or higher than 1 mg L⁻¹. In this situation, the pigment concentration tends to 0.

Regarding the interactions between temperature and the contaminant, an interaction of synergistic type was found between viability and cellular content of pigments. In this interaction, TCS effects are enhanced by temperature increases. An interaction, but of an antagonistic type, is also determined for the growth parameter.

REFERENCIAS

- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J. & Sturve, J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46(9-10): 1485-1489.
- Almeida, A. C., Gomes, T., Langford, K., Thomas, K. V. & Tollefsen, K. E. (2017). Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic toxicology*, 189: 50-59.
- Bhargava, H. N. & Leonard, P. A. (1996). Triclosan: applications and safety. *American Journal of Infection Control*, 24(3): 209-218.
- Bindesbøl, A. M., Holmstrup, M., Damgaard, C. & Bayley, M. (2005). Stress synergy between environmentally realistic levels of copper and frost in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6): 1462-1467.
- Boeckman, C. J., & Bidwell, J. R. (2006). The Effects of Temperature, Suspended Solids, and Organic Carbon on Copper Toxicity to Two Aquatic Invertebrates. *Water, Air, & Soil Pollution*, 171(1-4): 185-202.
- Bold, H. C. & Wynne, M. J. (1985). *Introduction to the Algae: structure and reproduction*. 2nd Ed. Prentice Hall. 720 pp.
- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R. & Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1092(2): 206-215.
- Chalew, T. E. & Halden, R. U. (2009). Environmental Exposure of Aquatic and Terrestrial Biota to Triclosan and Triclocarban 1. *Journal of the American Water Resources Association*, 45(1): 4-13.
- da Costa, C. H., Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Popovic, R. & Matias, W. G. (2016). Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of the Total Environment*, 565: 951-960.
- da Rocha, M. P., Dourado, P. L. R., Cardoso, C. A. L., Cândido, L. S., Pereira, J. G., de Oliveira, K. M. P. & Grisolia, A. B. (2018). Tools for monitoring aquatic environments to identify anthropic effects. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190: 61.
- Dann, A. B. & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology*, 31(4): 285-311.

- Ding, T., Lin, K., Bao, L., Yang, M., Li, J., Yang, B. & Gan, J. (2018a). Biouptake, toxicity and biotransformation of triclosan in diatom *Cymbella* sp. and the influence of humic acid. *Environmental Pollution*, 234: 231-242.
- Ding, T., Lin, K., Yang, M., Bao, L., Li, J., Yang, B. & Gan, J. (2018b). Biodegradation of triclosan in diatom *Navicula* sp.: Kinetics, transformation products, toxicity evaluation and the effects of pH and potassium permanganate. *Journal of Hazardous Materials*, 344: 200-209.
- Domingos, R. F., Simon, D. F., Hauser, C. & Wilkinson, K. J. (2011). Bioaccumulation and effects of CdTe/CdS quantum dots on *Chlamydomonas reinhardtii* – nanoparticles or the free ions? *Environmental Science & Technology*, 45(18): 7664-7669.
- Eriksson, K. M., Johansson, C. H., Fihlman, V., Grehn, A., Sanli, K., Andersson, M. X., Blanck, H., Arrhenius, A., Triranta, S. & Backhaus, T. (2015). Long-term effects of the antibacterial agent triclosan on marine periphyton communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(9): 2067-2077.
- Fai, P. B., Grant, A. & Reid, B. (2007). Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(7): 1520-1531.
- Galic, N., Sullivan, L. L., Grimm, V. & Forbes, V. E. (2018). When things don't add up: quantifying impacts of multiple stressors from individual metabolism to ecosystem processing. *Ecology Letters*, 21(4): 568-577.
- Gao, L., Yuan, T., Cheng, P., Bai, Q., Zhou, C., Ao, J., Wang, W. & Zhang, H. (2015). Effects of triclosan and triclocarban on the growth inhibition, cell viability, genotoxicity and multixenobiotic resistance responses of *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 139: 434-440.
- Garvey, M., Moriceau, B. & Passow, U. (2007). Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series*, 352: 17-26.
- González-Pleiter, M., Rioboo, C., Reguera, M., Abreu, I., Leganés, F., Cid, Á. & Fernández-Piñas, F. (2017). Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquatic toxicology*, 186: 50-66.
- Gorenoglu, E., Aydin, E., Topuz, E. & Pehlivanoglu-Mantas, E. (2018). Effect of triclosan and its photolysis products on marine bacterium *V. fischeri* and freshwater alga *R. subcapitata*. *Journal of Environmental Management*, 211: 218-224.

- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual review of plant biology*, 52(1): 363-406.
- Harris, E. H. (2009). *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use* (Vol. 1). 2nd Ed. Academic Press. 480 pp.
- Hu, C., Luo, Q. & Huang, Q. (2014). Ecotoxicological effects of perfluorooctanoic acid on freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5): 1129-1134.
- Humphreys, M. J., Allman, R. & Lloyd, D. (1994). Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry*, 15(4): 343-348.
- Jeanneret, R., Contino, M., & Polin, M. (2016). A brief introduction to the model microswimmer *Chlamydomonas reinhardtii*. *The European Physical Journal Special Topics*, 225(11-12): 2141-2156.
- Jeffrey, S. T. & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und physiologie der pflanzen*, 167(2): 191-194.
- Jochem, F. J. (1999). Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Marine biology*, 135(4): 721-728.
- Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L. & Lee, A. S. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 28(2): 184-196.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N. R. & Singh, R. (2012). Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp. *J Algal Biom Utilzn*, 3: 46-53.
- Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90(8): 2354-2366.
- Lund, E. D., Soudant, P., Chu, F. L. E., Harvey, E., Bolton, S. & Flowers, A. (2005). Effects of triclosan on growth, viability and fatty acid synthesis of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of aquatic organisms*, 67(3): 217-224.
- Mandaric, L., Diamantini, E., Stella, E., Cano-Paoli, K., Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., Bellin, A., Chiogna, G., Majone, B., Diaz-Cruz, M. S., Sabater, S., Barcelo, D. & Petrovic, M. (2017). Contamination sources and distribution patterns of pharmaceuticals and personal care products in Alpine rivers strongly affected by tourism. *Science of the Total Environment*, 590-591: 484-494.

- Mao, F., He, Y., Kushmaro, A. & Gin, K. Y. H. (2017). Effects of benzophenone-3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicology*, 193: 1-8.
- Melegari, S. P., Perreault, F., Costa, R. H. R., Popovic, R. & Matias, W. G. (2013). Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 142-143: 431-440.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F. & Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848): 245-250.
- Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., & Cunningham, V. (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(7): 1338-1349.
- Pan, C. G., Peng, F. J., Shi, W. J., Hu, L. X., Wei, X. D. & Ying, G. G. (2018). Triclosan-induced transcriptional and biochemical alterations in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 393-401.
- Park, B. K., Gonzales, E. L. T., Yang, S. M., Bang, M., Choi, C. S. & Shin, C. Y. (2016). Effects of triclosan on neural stem cell viability and survival. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(1): 99.
- Pino, M. R., Muñiz, S., Val, J. & Navarro, E. (2016). Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22): 22530-22541.
- Proia, L., Vilches, C., Boninneau, C., Kantiani, L., Farré, M., Romaní, A. M., Sabater, S. & Guasch, H. (2013). Drought episode modulates the response of river biofilms to triclosan. *Aquatic Toxicology*, 127: 36-45.
- Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Boninneau, C., Geiszinger, A., la-Farré, M., Ferrer, J., Ricciardi, F., Romaní, A. M., Morin, S., Proia, L., Sala, L., Sureda, D. & Sabater, S. (2010). Triclosan persistence through wastewater treatment plants and its potential toxic effects on river biofilms. *Aquatic Toxicology*, 100(4): 346-353.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A. & Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44(2): 578-588.

- Russell, A. D. (2004). Whither triclosan? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5): 693-695.
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 45-95.
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202(1): 1-7.
- Seoane, M., Esperanza, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2017). Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Chemosphere*, 171: 339-347.
- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4): 585-586.
- Xin, X., Huang, G., An, C., Huang, C., Weger, H., Zhao, S., Zhou, Y. & Rosendahl, S. (2018). Insights into the Toxicity of Triclosan to Green Microalga *Chlorococcum* sp. Using Synchrotron-Based Fourier Transform Infrared Spectromicroscopy: Biophysiological Analyses and Roles of Environmental Factors. *Environmental Science & Technology*, 52(4): 2295-2306.
- Yu, Z., Hao, R., Zhang, L., & Zhu, Y. (2018). Effects of TiO₂, SiO₂, Ag and CdTe/CdS quantum dots nanoparticles on toxicity of cadmium towards *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156: 75-86.

ABREVIATURAS

ACP	Proteína transportadora de grupos acilo.
EDAR	Estación de depuración de aguas residuales.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
FDA	Diacetato de fluoresceína.
HE	Hidroetidina.
PCP	Producto de higiene personal.
TAP	Tris-acetato fosfato.
TCS	Triclosán.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.